FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1962 N° 76

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CAPACITE DE FIXATION EN FER DU SERUM

Technique de dosage utilisant le fer radioactif et une résine échangeuse d'ions

Travail de la Clinique Médicale C (Pr CROIZAT)
et du Laboratoire de Chimie Hématologique
de l'Institut Pasteur de Lyon

T H E S E

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

et soutenue publiquement le 29 Mai 1962

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

GAUTHIER Stéphane
Ancien Externe en Premier des Hôpitaux de Lyon
Né le 10 Juin 1930
à LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1962 N° 76

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CAPACITE DE FIXATION EN FER DU SERUM

Technique de dosage utilisant le fer radioactif et une résine échangeuse d'ions

Travail de la Clinique Médicale C (Pr CROIZAT)
et du Laboratoire de Chimie Hématologique
de l'Institut Pasteur de Lyon

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

T H E S E

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

et soutenue publiquement le 29 Mai 1962

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

GAUTHIER Stéphane
Ancien Externe en Premier des Hôpitaux de Lyon
Né le 10 Juin 1930
à LYON

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550012_0019

Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de Lyon

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire
Membre de l'Institut

M. H. HERMANN : Doyen
Correspondant de l'Institut

M. M. LEVRAT, Assesseur
L. REVOL, Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

Professeurs

MM. HERMANN	Physiologie
CIBERT	Clinique urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale
ROCHET	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
GUILLEMINET	Clinique de chirurgie orthopédique et de chirurgie infantile
REVOL	Pharmacie galénique et matière médicale
POLLOSSON	Clinique gynécologique
PIGEAUD	Clinique obstétricale
BOURRET	Médecine du Travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
DUCLOS	Clinique stomatologique
BERNHEIM	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge
JOURDAN	Biologie médicale et pharmacodynamie
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSEL	Clinique traumatologique des membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale

MM. LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
KEHL	Histologie et embryologie
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique des maladies infectieuses
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
DORCHE	Technologie pharmaceutique
CIER J. François	Physiologie
BERTOYE A.	Bactériologie.

PROFESSEURS sans Chaire

CHATONNET	Physiologie
CIER André	Pharmacie chimique et pharmacologie
PERROT	Chimie organique et toxicologie
ROMAN	Parasitologie

MAITRES de CONFERENCES - Agrégés

Médecine

FEROLDI	Anatomie pathologique
CREYSSEL Roger	Chimie biologique et médicale
DUROUX Emile	Anatomie
BRETTE René	Thérapeutique
DUMONT Louis	Histologie
THIVOLET Jean	Hygiène
GARIN Jean Paul	Parasitologie
MORET Robert	Physique
BOUCHET Alain	Anatomie
TOMMASI Michel	Anatomie pathologique
RIFFAT Georges	Hygiène
JOUVET Michel	Pathologie expérimentale
FAVRE-GILLY Jean	Hématologie

Pharmacie

ODDOUX Lucien	Botanique et cryptogamie
MALLEIN René	Chimie analytique
GRAS Jean	Chimie biologique
PEYRIN Jean-Olivier	Physique

AGREGES en EXERCICE

GUINET Paul	Médecine générale
PONT Maurice	- -
VIGNON Georges	- -
REVOL Louis	- -
PLAUCHU Marcel	- -
TRAEGER Jules	- -

MARION Pierre	Chirurgie générale
MICHAUD Pierre	- -
JAUBERT de BEAUJEU Michel	- -
SAUTOT Jean	- -
GUILLEMIN Georges	- -
BURTHIAULT René	Obstétrique
GIGNOUX Marcel	Oto-rhino-laryngologie
FRANCOIS René	Pédiatrie
FREIDEL Charles	Stomatologie
DEVIC Michel	Médecine générale
DESPIERRES Charles	- -
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale
FRANCILLON Jacques	- -
SAUBIER Eugène	- -
COLOMB Daniel	Dermatologie
COLIN Marcel	Médecine légale
TOLOT François	Médecine du Travail
GUYOTAT Jean	Neuro-Psychiatrie
SCHOTT Bernard	Neuro-Psychiatrie
DUMONT Martial	Obstétrique
BONAMOUR Georges	Ophtalmologie
DURAND Louis	Urologie
GARDE Alexandre	Médecine générale
PERRIN André	- -
LARBRE François	- -
MORNEX René	- -
NORMAND Jean	- -
MARET Gilbert	Chirurgie générale
DESCOTES Jacques	- -
CHASSARD Jean-Louis	Electro-radiologie
ALLEGRE Georges	Neuro-chirurgie
HUGONNIER René	Ophtalmologie
FAŸSSE Robert	Orthopédie
GAILLARD Jean	Oto-rhino-laryngologie
KALB Jean-Claude	Pneumo-phtisiologie

Examinateurs de la Thèse :

Monsieur le Professeur P. CROIZAT, Président,

Messieurs A. BERTOYE

L. REVOL

R. CREYSSEL

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS PARENTS

et plus particulièrement à celle de mon GRAND PERE MATERNEL

A MES PARENTS

Les sacrifices consentis par mon père, le dévouement de tous les instants de ma mère, leur donnent davantage droit à mon affection et à mon respect.
Qu'ils trouvent ici un bien modeste témoignage de ma reconnaissance.

A MA FIANCEE

Elle s'apprête à partager ma vie d'homme et de Médecin, mais depuis plusieurs mois elle est la compagne précieuse dont la collaboration permanente soutient mes efforts et rend possible la réalisation de ce travail. Celui-ci restera pour nous le témoignage le plus affectueux de son Amour.

A TOUS LES MIENS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. CROIZAT,
Professeur de Clinique Médicale,
Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon.

Au cours d'un semestre d'Externat, puis durant deux années passées à ses côtés, dans son Service et à l'Institut Pasteur, nous avons toujours été séduit par la précision de son Enseignement, l'étendue de son expérience et sa très grande bonté. Nous lui sommes redevable de l'extrême amabilité avec laquelle il a bien voulu nous accueillir dans ses Laboratoires et tenons à le remercier profondément de la grande sollicitude qu'il nous a toujours manifestée. Puisse-t-il trouver ici le modeste témoignage de notre reconnaissance et de notre respectueux attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur BERTOYE,
Médecin des Hôpitaux
Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon

Quoique nous n'ayons pas été directement son élève, il a bien voulu siéger parmi nos juges, ce dont nous lui sommes tout particulièrement reconnaissant. Qu'il veuille trouver ici le témoignage de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé L. REVOL,
Médecin des Hôpitaux

Nous avons pu au cours d'un semestre d'Externat apprécier l'étendue de ses connaissances et le charme de son enseignement. Depuis, il a toujours fait preuve à notre égard d'une extrême bienveillance. Il nous fait l'honneur aujourd'hui d'accepter de nous juger. Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur Agrégé R. CREYSSEL,

Nous lui devons tout.

En nous accueillant dans ses Laboratoires, il a bien voulu nous honorer de sa confiance. Sa haute compétence sur les problèmes biologiques, son dynamisme, la clarté de son enseignement et la sûreté de ses déductions nous ont toujours profondément impressionné. Ses encouragements et ses conseils nous ont été une aide précieuse pour l'élaboration de ce travail. Il sait déjà la respectueuse admiration que nous avons pour lui.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Externat de Lyon

Monsieur le Professeur Agrégé J. PERRIN
Monsieur le Professeur MALLET-GUY
Monsieur le Professeur PEYCELON
Monsieur le Professeur Agrégé J. MARION
Monsieur le Professeur CROIZAT
Monsieur le Professeur Agrégé REVOL
Monsieur le Docteur LAGEZE

Internat Provisoire de Lyon

Monsieur le Professeur Agrégé A. TRILLAT

AUX MEDECINS DE LA CLINIQUE DE LA SALETTE

Monsieur le Professeur MAYOUX, in memoriam
Monsieur le Professeur CLAVEL, in memoriam
Monsieur le Professeur GUICHARD
Monsieur le Docteur LAGEZE
Monsieur le Professeur LATARJET
Monsieur le Professeur Agrégé SAUBIER
Messieurs les Docteurs MESTRALLET
TARTULIER
DEYRIEUX
FONTES
MULETIER

A nos Conférenciers d'Externat et d'Internat

A tous ceux qui nous ont aidé dans l'élaboration de cette thèse et en particulier à Madame MARTEL sans laquelle ce travail ne serait pas.

Au personnel du Laboratoire de Chimie hématologique de l'Institut Pasteur de Lyon.

Aux Soeurs du Pavillon H Bis

A tous nos camarades de l'Externat

A nos Amis

I N T R O D U C T I O N

L'exploration du métabolisme du fer, grâce au perfectionnement des techniques chimiques, avec le dosage de la sidérémie et celui de la sidérophiline, grâce surtout à l'utilisation des radio-éléments et en particulier du radio-fer, isotope idéal pour l'étude dynamique du métabolisme normal pathologique du fer dans l'organisme, est passée en quelques années du domaine de la recherche à celui de la pratique, occupant actuellement dans l'élaboration d'un certain nombre de diagnostics hématologiques une place de premier plan.

En effet, en hématologie, les méthodes physiologiques, biochimiques et immunologiques prennent de plus en plus d'importance à côté des méthodes morphologiques classiques. Et grâce aux radio-isotopes, il devient plus facile dans certains états morbides d'appuyer le diagnostic et la thérapeutique sur une interprétation physio-pathologique approfondie des processus responsables de l'affection.

Grâce à l'appui de Monsieur le Professeur SEDALLIAN et de Monsieur le Professeur CROIZAT, les laboratoires de chimie biologique de l'Institut Pasteur de Lyon à l'hôpital E. Herriot que dirige Monsieur le Professeur Agrégé R. CREYSSEL, sont dotés depuis près de cinq ans de l'équipement permettant la pratique d'un certain nombre d'investigations isotopiques.

Ainsi furent mises au point à Lyon par Madame CREYSSEL, sous la direction et avec l'aide de Monsieur le Professeur BERGER et de ses collaborateurs, l'étude de l'exploration fonctionnelle de l'érythropoièse par le radio-fer et celle de la survie des hématies marquées au chrome 51.

Monsieur le Professeur agrégé CREYSSEL, il y aura bientôt trois ans, nous a fait l'honneur de nous accueillir dans ses laboratoires et de nous charger de la réalisation de ces techniques isotopiques. C'est avec une patience inlassable qu'il a

guidé nos premiers pas dans la pratique de cette discipline dont nous ignorions tout. Ses encouragements et ses conseils nous ont toujours été une aide très précieuse. Qu'il en soit tout particulièrement remercié.

L'utilisation des radio-éléments et plus spécialement du radio-fer, nous a tout naturellement conduit à aborder un certain nombre de problèmes posés en particulier par l'absorption et le transport du fer ; et nous intéressant surtout aux propriétés physiologiques de la sidérophiline et aux techniques de dosage de la capacité de fixation en fer du sérum, nous avons entrepris sous la direction et le contrôle de Monsieur le Professeur Agrégé CREYSSEL, l'étude et la mise au point d'une nouvelle technique de dosage de cette capacité, utilisant à la fois le radio-fer et une résine échangeuse d'ions.

Après un bref rappel du rôle joué par le fer radioactif dans les diagnostics de laboratoire, nous envisagerons l'ensemble des méthodes permettant la détermination de la capacité de fixation en fer du sérum avant d'exposer la technique que nous avons utilisée et d'essayer d'en éprouver la validité.

C H A P I T R E II

LE RADIO-FER DANS LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

Il existe deux isotopes radioactifs du fer utilisables en biologie :

- Le Fer 55 dont la période est de cinq ans, émettant par capture d'électrons des rayons X de très faible énergie et difficilement détectables avec un rendement appréciable.

- Le Fer 59 dont la période est de 47 jours et qui se désintègre selon deux schémas, un bêta d'énergie faible (0,46 Mev) puis un gamma de 1,10 Mev.

Ce dernier, de beaucoup le plus utilisé en médecine, a permis d'élucider un grand nombre de problèmes biologiques, et en particulier a permis de tracer ce que SCHAPIRA appelle "La route métabolique du fer" ; et actuellement, absorption, transport plasmatique, mise en réserve, utilisation pour former de nouveaux érythrocytes, sont couramment inventoriés par de nombreux laboratoires.

1 - Appréciation de l'absorption digestive

Des méthodes permettant l'étude de l'absorption digestive du fer, seule celle utilisant le fer radioactif est une méthode directe, par mesure de la radioactivité dans les fèces mais aussi par mesure du pourcentage de fer passé dans le torrent circulatoire. Méthode laborieuse certes, mais d'assez grande précision, compte tenu des pertes radioactives inévitables lors des manipulations fécales, en tout cas méthode beaucoup moins astreignante pour les malades que la classique épreuve d'hypersidérémie.

2 - Etude des mouvements du fer "in vivo"

Ceux-ci sont aisément suivis en étudiant le devenir d'une dose traceuse de fer radioactif injectée par voie intraveineuse après incubation préalable en présence d'une certaine quantité de plasma dont on a vérifié auparavant la capacité de fixation. Lorsque celle-ci est suffisante, l'auto-radiographie après électrophorèse des protéines montre que la totalité du fer radioactif est présente dans la bande des bêta globulines, confirmant ainsi le rôle joué par la sidérophiline dans le transport plasmatique.

Le complexe bêta 1 globulines-fer s'étant formé, le sérum marqué est réinjecté et des échantillons plasmatiques sont prélevés à intervalles de 5, 15, 30, 60 et 120 minutes après l'injection et la radioactivité du plasma est mesurée au moyen d'un scintillomètre. Dans les conditions normales, la radioactivité décroît de façon exponentielle, s'abaissant de moitié en 1 h 30 environ.

Connaissant le volume plasmatique et le taux du fer sérique, il est alors possible de calculer la quantité de fer renouvelée en 24 h (Turnover sérique).

L'utilisation du fer pour la synthèse de l'hémoglobine est évaluée en suivant jour après jour le passage du radio-fer dans les hématies néo-formées. Connaissant la quantité de radio-fer injectée, le volume sanguin et la radioactivité des hématies à différents intervalles après l'injection, on peut établir le pourcentage du fer utilisé pour l'érythropoïèse.

En étudiant l'évolution de la radioactivité au niveau du sacrum, des aires spléniques et hépatiques, on peut enfin dresser des courbes correspondant à la fonction érythroïètique ou de stockage du fer de ces différents organes.

3 - Synthèse de l'hémoglobine "in vitro"

Celle-ci peut être étudiée de la façon suivante :

- Les érythrocytes une fois lavés au sérum physiologique, sont mis à incuber durant quelques minutes avec du plasma marqué au fer 59. Après trois lavages au sérum physiologique, la radioactivité totale globulaire est déterminée, exprimée en pourcentage de la radioactivité totale du plasma ajouté.

4 - Autres applications du radio-fer

Outre l'étude du métabolisme normal et pathologique du fer dans l'organisme, le radio-fer permet la réalisation d'un certain nombre de dosages intéressant l'hématologiste et en particulier celui de l'haptoglobine et de la capacité de fixation en fer du sérum. C'est à la mise au point de ce dernier dosage que nous nous sommes tout particulièrement attaché.

C H A P I T R E III

METHODES DE DOSAGE DE LA CAPACITE DE FIXATION EN FER DU S E R U M

Très nombreuses sont actuellement les méthodes permettant de déterminer avec plus ou moins de précision la capacité de fixation en fer du sérum. Nous n'avons retenu dans cet exposé que les principales et les avons placées en 3 grands groupes correspondant aux différents principes dont elles dérivent.

1 - La méthode de surcharge "in vivo"

Mise au point en 1952 par Gitlow et Beyers, cette méthode est une simple détermination du taux de la sidérémie avant et après saturation plasmatique que l'on réalise par injection intraveineuse d'un sel de fer.

2 - La méthode directe de Schade et Caroline

De beaucoup la plus utilisée actuellement, cette méthode est un dosage par mesure directe spectrophotométrique de la coloration rose du complexe fer-protéïne, c'est-à-dire une détermination de la quantité de fer qu'on peut ajouter "in vitro" au sérum jusqu'à ce que la coloration reste stable.

3 - Les méthodes indirectes

Très nombreuses, elles dérivent toutes du même principe qui consiste dans un premier temps à saturer le sérum par une quantité connue de fer, puis dans un deuxième temps à doser

- soit le fer non fixé par un réactif approprié,
- soit le fer combiné à la sidérophiline après l'avoir préalablement séparé du fer libre.

A - Technique de Laurell et Holmberg

Cette méthode consiste à doser directement le métal non combiné par l'alpha - alpha'dipiridyle. Abandonnée peu après sa mise au point, elle fut reprise ultérieurement et modifiée en 1954 par Schade et ses collaborateurs, puis simplifiée en 1958 par Ressel et Zak. Les différentes modifications et en particulier le remplacement de l'alpha - alpha'dipiridyle par la tripyridine permirent d'obtenir de meilleurs résultats quantitatifs, et actuellement, cette méthode est utilisée dans de nombreux laboratoires avec des résultats comparables à ceux que l'on obtient par la technique classique de Schade et Caroline.

B - Technique de Laurell

Mise au point en 1947, elle est basée sur l'obtention d'un complexe fer non lié-phénantroline insoluble en milieu acide. Après formation de ce complexe, les protéïnes du sérum sont précipitées par l'adjonction d'acide chlorhydrique et d'acide trichloracétique. Le complexe fer libre-phénantroline est donc entraîné avec les protéïnes, ce qui permet après centrifugation de doser la teneur en fer du surnageant, c'est-à-dire de déterminer la capacité totale de fixation.

C - Technique de Feinstein modifiée par Tinguely

Dans cette technique, l'élimination du fer demeuré libre est effectuée en précipitant par l'éthanol la suspension colloïdale obtenue en ajoutant au sérum saturé une certaine quantité de sulfate de fer et d'ammonium neutralisé. Mais la grande originalité de cette méthode, malgré sa complexité, réside dans le fait que la solution de fer utilisée pour la saturation est marquée par une faible quantité de Cl_3 Fe 59, ce qui permet, connaissant la radioactivité totale utilisée et la radioactivité du précipité, de déterminer la capacité latente de fixation sans faire appel à une mesure photométrique, donc d'effectuer le dosage sur tout sérum, qu'il soit lactescent, trouble ou même ictérique.

D - Technique de Ramsay

Ramsay en 1957 parvint à déterminer la capacité totale de fixation, en partant du principe que le Fe +++ est absorbé sur du carbonate de magnésium tandis que le fer combiné à la sidérophiline ne l'est pas.

E - Les techniques utilisant une résine échangeuse d'ions

De plus en plus nombreuses, elles dérivent toutes de la technique décrite en 1956 par Peters et ses collaborateurs, technique qui consiste à saturer le sérum, à étudier par une quantité connue de citrate de fer et d'ammonium, puis à doser la quantité de fer contenue dans le sérum après avoir éliminé au moyen d'une résine échangeuse d'ions la presque totalité du fer excédentaire.

En 1959 Bothwell simplifie de façon très originale cette technique, en marquant, comme l'avait décrit Feinstein, la solution de fer utilisée pour saturer le sérum par une faible quantité de Cl_3 Fe 59, supprimant ainsi tous les inconvénients de la lecture photométrique terminale.

Cette méthode est celle que nous avons utilisée en lui apportant quelques légères modifications. Elle semble, du fait de sa simplicité et de sa précision, appeler un certain avenir comme en témoignent les publications récentes de plusieurs auteurs et en particulier de Tauxe, Norman Lee et Chiamory.

Nous décrirons en détail cette technique dans le chapître suivant.

C H A P I T R E IV

TECHNIQUE UTILISEE

La technique de dosage que nous avons utilisée, comme la méthode de Bothwell dont elle s'inspire, consiste à saturer le sérum à étudier par une quantité connue de radio-fer, puis à évaluer le pourcentage de fer fixé après avoir éliminé au moyen d'une résine échangeuse d'ions la presque totalité du fer libre excédentaire.

1 - Préparation des réactifs

Ceux-ci sont au nombre de trois :

- Une solution radioactive de citrate de fer et d'ammonium
- Une solution tampon pH 7,5
- Une résine échangeuse d'ions.

A - Solution mère de citrate de fer et d'ammonium

On pèse très soigneusement une quantité déterminée de perchlorure de fer (Cl_3 Fe 6 H20) que l'on dissout dans 100 ml d'eau désionisée. On pipette ensuite 1 ml de cette solution que l'on dépose dans un ballon de 20 ml dans lequel on a préalablement mis une quantité donnée de Cl_3 Fe 59. Celle-ci est variable, fonction de l'ancienneté du radio-élément, n'excédant pas une dizaine de micro-curies.

On ajoute alors à l'aide d'une pipette Pasteur quelques gouttes d'ammoniaque ; il se forme un précipité brunâtre que l'on remet en solution par adjonction de quelques cristaux d'acide citrique. Il est préférable de laisser le ballon quelques minutes au bain marie à 50° avec agitation manuelle douce de temps à autre, jusqu'à ce que la solution de citrate de fer ammoniacal soit devenue parfaitement limpide, ayant pris une coloration jaune orangé.

On complète enfin à 20 ml après avoir contrôlé le pH qui doit être à 7-7,5.

Nous utilisons comme indicateur un papier sélectif et pour ajuster s'il y a lieu au pH voulu, ajoutons quelques gouttes d'eau désionisée ammoniacale ou acidulée.

Certains auteurs, et en particulier les promoteurs de la méthode, effectuent une centrifugation après avoir précipité le chlorure ferrique par l'ammoniaque afin d'éliminer le surnageant. Nous n'estimons pas nécessaire cette élimination qui est une opération fort délicate, étant donné la faible quantité de surnageant, et ne l'avons pratiquée que durant la première série de mesures.

La solution mère ainsi préparée est stockée dans un réfrigérateur à 4°. Dans ces conditions elle peut rester stable et conserver sa limpidité et son efficacité durant plus d'un mois.

Il est essentiel que la teneur en fer de cette solution soit très exactement mesurée, et nous avons adopté pour la contrôler la technique de Helmeyer et Plotner modifiée par Barkan et Walker, technique utilisée d'une façon routinière depuis plusieurs années dans les services lyonnais de l'Institut Pasteur.

Cette méthode est basée sur l'obtention d'une coloration rose saumon due à la formation d'un complexe fer-phénantroline. Celui-ci est assez lent à se développer, beaucoup plus lent que lorsqu'il s'agit d'un sérum, la réaction étant rarement complète avant 24 heures.

La lecture spectrophotométrique à 510 mμ permet de déterminer la teneur en fer de la solution en reportant la valeur de la densité optique obtenue sur la courbe étalon. Celle-ci, représentée par une droite, est établie en contrôlant la densité optique d'un certain nombre d'échantillons correspondant à des dilutions croissantes d'une solution de sel de Mohr (protosulfate de fer et d'ammonium) contenant 500 gamma de fer par cm3.

B - Solution tampon

Nous avons utilisé pour la plupart de nos déterminations un tampon véronal que nous préparons de la façon suivante :

Après avoir dissout dans 500 cm3 d'eau désionisée 6,4 gr de chlorure de sodium de 2,3 gr de véronal sodé, on ajoute au mélange 6 gr de véronal acide. Il est nécessaire d'opérer à chaud pour obtenir une dissolution complète. Celle-ci effectuée, et après refroidissement, on verse le contenu du récipient dans un ballon jaugé et l'on complète à 1 litre avec de l'eau désionisée.

Le pH du tampon véronal ainsi préparé doit être égal à 7,5.

C - Résine

Tous nos dosages ont été effectués avec la résine Amberlite IRA 401. Nous faisons d'abord subir à cette résine un très grand nombre de lavages à l'eau désionisée puis la laissons dans un bain d'acide chlorhydrique 3 N durant 48 heures. Après une deuxième série de lavages nous la laissons séjourner plusieurs heures dans une grande quantité de tampon véronal. Le pH se stabilise aux alentours de 6. Nous l'ajustons alors à 7,5 avec quelques gouttes de soude peu concentrée puis séchons au four à 90°.

La résine ainsi préparée est conservée à l'abri de l'humidité dans un bocal hermétiquement fermé.

2 - Prélèvement des échantillons

Hormis les quelques cas où nos mesures furent effectuées en séries sur de grandes quantités de sérum obtenues par saignée, nous nous sommes chaque fois servi du matériel spécial pour prélèvement utilisé par le Laboratoire de Chimie de l'Institut Pasteur pour la détermination des fers sériques.

Ce matériel est composé d'une aiguille à plateau en acier inoxydable et d'un tube de verre cylindrique d'une contenance

de 20 ml. Après lavage soigneux, passage sur mélange sulfochromique, rinçage à l'eau distillée et séchage au four, ces deux éléments sont placés dans une boîte en aluminium et stérilisés au poupinel.

20 ml de sang sont donc prélevés sur tube sec. Après la rétraction du caillot que l'on laisse s'effectuer à température ambiante, une centrifugation à 4.000 T/M, durant 20 minutes, permet d'obtenir une quantité suffisante de sérum pour effectuer les dosages du fer sérique et de la capacité latente de fixation tant par la méthode au radio-fer que par une méthode photométrique de contrôle.

3 - Technique proprement dite

A - Préparation de l'échantillon

Dans un tube à centrifuger de 15 cm3 environ contenant 1 cm3 du sérum à analyser, on ajoute très exactement à l'aide d'une micropipette de précision 0,2 cm3 de la solution mère de citrate de fer ammoniacal. La quantité de fer ajoutée est telle que la capacité totale de fixation est très largement dépassée.

Le mélange est ensuite laissé une heure à température ambiante ou 20 minutes à 37° avec de temps à autre agitation manuelle douce afin d'assurer un meilleur marquage, et d'éviter surtout qu'une quantité même infime de fer déposé par mégarde sur la partie supérieure des parois du tube, ne soit pas en contact avec le sérum.

Le marquage étant effectué, on ajoute 5 ml de tampon véronal puis immédiatement après 400 mg environ de résine Amberlite IRA 401.

Après agitation très énergique durant quelques minutes, le mélange est alors centrifugé à grande vitesse pendant dix minutes. Il est alors aisé de prélever à l'aide d'une pipette Pasteur une certaine quantité de surnageant.

Après s'être assuré qu'aucun grain de résine n'a été prélevé malencontreusement, on pipette enfin 1 cm3 de cette solution à tester que l'on dépose dans un tube à hémolyse.

B - Préparation de l'aliquot

Afin de connaître la radioactivité totale administrée, on prépare un aliquot de la façon suivante :

Dans un tube à essai, on dépose successivement par pipetage 0,2 cm3 de la solution mère et 6 cm3 d'eau correspondant aux 5 cm3 de tampon ajoutés au sérum marqué. Puis on pipette 1cm3 que l'on dépose également dans un tube à hémolyse.

C - Mesure de la radioactivité

La mesure de la radioactivité est faite dans nos Laboratoires de l'Institut Pasteur à l'aide d'un compteur à scintillation Tracerlab P 20 CW à puits (à iodure de sodium), avec un démultiplicateur décadique raccordé à une minuterie externe, ayant un mouvement de base, plus communément appelé mouvement propre d'environ 350 C/M. Chaque échantillon à doser est placé au centre du cristal, chaque détermination est faite sur 5 minutes. L'aliquot est ensuite compté de la même façon.

4 - Détermination par le calcul de la capacité latente de fixation

Connaissant la radioactivité totale utilisée et la radioactivité restante après passage sur résine du sérum marqué, il est très simple d'en déduire la capacité latente de fixation (LIBC).

Celle-ci traduite en microgrammes pour 100 cm3 de sérum se détermine en appliquant la formule suivante :

$$LIBC = \frac{A - MP}{B - MP} \times 100 \times Q\ Fe$$ où :

MP représente le mouvement propre du compteur,

A la radioactivité traduite en C/M d'un cm3 de l'échantillon à mesurer,

B celle d'un cm3 de l'aliquot,

Q Fe la quantité de fer ajoutée au sérum et contenue dans l'aliquot.

5 - Sécurité à l'égard des radiations

Sans vouloir attacher trop d'importance aux dangers que peuvent représenter nos manipulations radioactives et bien que nous n'ayons toujours travaillé qu'à doses traceuses tant pour la détermination de la LIBC que pour tout autre investigation isotopique, il nous semble opportun cependant de rappeler l'ensemble des mesures élémentaires prises pour lutter contre le risque éventuel d'irradiation exogène et endogène.

A - Tous nos échantillons radioactifs, quelle que soit leur provenance, sont stockés dans les laboratoires de physique médicale dont les locaux ont été aimablement mis à notre disposition par Monsieur le Professeur BERGER. Ces échantillons sont enfermés dans un coffre de plomb à parois très épaisses. Le prélèvement de la dose de fer nécessaire à la préparation de la solution mère s'effectue sur place derrière un écran de plomb.

B - La solution mère une fois préparée est placée dans un étui en plomb et stockée dans un local spécial, enfermée dans un réfrigérateur.

C - Chaque personnel est porteur d'un film radiologique de contrôle développé tous les 15 jours.

D - Quant aux précautions à prendre lors des manipulations que nécessite chaque détermination, elles restent celles qui sont indispensables pour parer aux dangers de dissémination, de contamination radioactive et d'ingestion accidentelle.

6 - Problème de la décontamination du matériel

L'emploi d'une verrerie imparfaitement décontaminée représentant une source d'erreurs très importante, il est capital d'utiliser, pour chaque détermination, du matériel neuf ou préalablement vérifié par comptage. Car si le lavage à l'eau courante continue se révèle efficace pour la décontamination de la plupart des tubes et pipettes ayant servi aux dosages, il n'en est pas de même pour la verrerie utilisée pour la préparation de la solution mère et la détermination de l'aliquot.

Nous devons donc faire appel :

- soit au vieillissement, procédé de beaucoup le plus simple mais entraînant une trop longue immobilisation de la verrerie.

- soit à l'emploi du mélange sulfo-chromique, mais nul n'ignore les inconvénients de ce produit, son action relativement lente et surtout son agressivité vis-à-vis des téguments et des effets vestimentaires.

Depuis quelques semaines nous expérimentons un nouveau produit, le concentré "RBS 25" substance inoffensive, très efficace semble-t-il et d'action beaucoup plus rapide que le mélange sulfo-chromique.

C H A P I T R E V

RESULTATS

1 - Choix des échantillons

L'ensemble de notre travail porte sur 350 dosages effectués sur un lot de 80 sérums différents ainsi répartis :

- dix sérums de sujets normaux, donneurs bénévoles, qui nous permirent l'étude de la capacité latente normale.
- seize sérums de saignée provenant de malades hospitalisés dans le service du Professeur CROIZAT et du Docteur REVOL, pour la plupart hémochromatosiques ou polyglobuliques.
- 54 sérums de malades, aimablement mis à notre disposition par Madame MARTEL, responsable des techniques de dosage du fer sérique. Nous tenons tout particulièrement à la remercier ici. Nous avons en effet toujours trouvé auprès d'elle une aide précieuse et une grande part de ce travail lui revient.

Nous n'avons tenu aucun compte du sexe, de l'âge des sujets, de leur état physique, de la nature de l'affection pour laquelle ils étaient hospitalisés et ne prétendons pas comme Golhen (Thèse de Lyon 1958) faire une présentation de cas avec dosage dans les différents états pathologiques.

2 - Valeur de la LIBC chez le sujet normal

Nous avons pratiqué le dosage de la capacité latente de fixation chez dix sujets normaux.

La capacité totale de fixation (TIBC) correspondant à la sidérophiline totale fut déterminée en additionnant à la valeur de la LIBC celle de la sidérémie et le coefficient de saturation CS fourni par le rapport $\frac{FS}{TIBC}$.

Toutes nos mesures sont récapitulées dans le tableau I

TABLEAU I

Numéros	F S	L I B C	T I B C	C S
1	137	205	342	0,40
2	108	232	340	0,31
3	137	187	324	0,42
4	148	196	344	0,43
5	140	206	346	0,40
6	120	234	354	0,33
7	148	187	335	0,44
8	130	194	324	0,39
9	146	195	341	0,42
10	142	187	329	0,43
Moyenne	131	202	337	0,39

ABREVIATIONS :

F S : Fer sérique
LIBC : Capacité latente de fixation
TIBC : " totale de fixation
C S : Coefficient de saturation.

Nos données personnelles s'avèrent en accord complet avec celles de la littérature.

Il faut toutefois noter le très petit nombre de publications consacrées à cette technique. Un certain nombre d'auteurs en effet font appel à un échangeur d'ions pour éliminer le fer libre excédentaire, mais la plupart déterminent la capacité

totale de fixation par un dosage de la teneur en fer du sérum ainsi saturé. Cette méthode est certes plus longue, mais reste très valable et précieuse pour les Laboratoires ne possédant pas l'équipement particulier que nécessite toute investigation isotopique.

I - Méthodes utilisant les résines échangeuses d'ions

	LIBC	TIBC	CS
Technique personnelle (Fe 59)	202	337	0,39
Peters (1956)	214	333	
Bothwell (1959) (Fe 59)		331	
Henry et Coll. (1958)	140 à 280		

II - Autres méthodes

Nous nous sommes borné à reproduire les valeurs exposées dans deux publications françaises récentes qui ne font que confirmer les statistiques antérieures effectuées par de très nombreux auteurs et en particulier Holmberg et Laurell, Fay, Fowler, Gitlow, Kaldor et Tompsett.

		LIBC	TIBC	CS	
Schapira	♂	205	340	0,40	Schade et Caroline
	♀	218	340	0,35	
Gohlen (1958)	♂	210	340	0,42	Schade et Caroline
	♀	225	340	0,37	

C H A P I T R E VI

VALIDITE DE LA METHODE

Les résultats que nous venons d'exposer au chapître précédent, bien que fort intéressants, sont loin d'être entièrement significatifs et pour que soit qualifiée de valable notre méthode, il est indispensable que soient vérifiés le rendement du marquage mais aussi l'efficacité de la résine.

Nous avons de plus étudié la reproductibilité de nos résultats et fait effectuer un grand nombre de dosages comparatifs, utilisant comme référence la méthode spectrophotométrique de Schade et Caroline.

1 - Rendement du marquage

Pour que celui-ci soit complet, il est indispensable que soient respectées un certain nombre de conditions. En effet, le rendement du marquage est étroitement lié d'une part à la durée de l'incubation, d'autre part à la température à laquelle est effectué le marquage.

Toutes nos déterminations ont été réalisées après un marquage dont la durée moyenne fut de une à deux heures. Nous avons cependant essayé de réduire la durée de cette incubation tout en opérant à des températures variables.

A - A température ambiante

Nous avons obtenu des résultats très valables avec une durée d'incubation inférieure à 15 minutes dans les conditions normales du marquage, c'est-à-dire à température du laboratoire. Un temps de contact plus bref en revanche détermine le plus souvent des résultats aberrants.

B - A 4°

Le temps de contact lorsque l'incubation s'effectue dans un réfrigérateur à 4°, doit être d'au moins 3 heures pour assurer un marquage efficace.

C - A l'étuve

Deux de nos dosages furent effectués après une incubation de 3 minutes seulement à 37°. Les résultats que nous avons obtenus s'avérèrent identiques à ceux trouvés lorsque l'incubation était de une heure à température ambiante.

2 - Efficacité de la résine

La résine est-elle capable de déplacer la totalité du fer libre excédentaire ?

Peters et ses collaborateurs en 1956 estiment à 3,8% le pourcentage de Fe 59 retrouvé après passage sur résine.

Mais les Travaux de Henry et Chiamory en 1958 sont loin d'apporter des valeurs identiques. Ces auteurs, utilisant la résine IRA 401 estiment en effet que cet échangeur est capable de soustraire au sérum la totalité du fer non fixé. Ils pensent ainsi démontrer la supériorité de ce dernier sur la résine IRA 410 seule utilisée par Peters.

Mais plus récemment Bothwell, Jacobs et Kamener, utilisant indifféremment les résines IRA 410 et IRA 401 obtinrent des résultats semblables avec un pourcentage de fer non déplacé n'excédant pas 0,6 %.

Nous avons essayé de notre côté de tester la résine IRA 401 dont nous nous sommes servi pour toutes nos déterminations. Nous avons pratiqué pour cela deux séries de tests :

A - Etude du comportement de l'échangeur en présence d'une solution de citrate de fer et d'ammonium.

Cette étude fut effectuée en mesurant la radioactivité avant et après passage sur résine d'un cm3 de cette solution

préparée en ajoutant 0,2 cm3 de notre réactif de base à 5 cm3 d'eau distillée ou non.

Nous avons pratiqué 5 mesures, chacune correspondant à une solution mère différente.

Le tableau n° II montre l'ensemble de nos résultats, le pourcentage moyen de fer libre déplacé atteignant 99,5 %

TABLEAU II

N°	Valeurs exprimées en C/M		Pourcentages
	avant	après	
1	35.000	120	99,7 %
2	46.000	200	99,6 %
3	61.000	200	99,7 %
4	37.000	360	99 %
5	64.000	190	99,8 %

B - Comportement de l'échangeur en présence d'une solution biologique marquée.

Après avoir préparé et dosé deux solutions mère de citrate de fer ammoniacal :

- l'une radioactive (solution A)
- l'autre non radioactive (solution B)

Nous avons évalué les déplacements ioniques de notre échangeur de la façon suivante :

Cinq sérums différents furent saturés par adjonction de 0,2 cm3 de la solution B, puis après incubation, marqués par 0,05 cm3 de la solution A.

Nos résultats se sont avérés très différents suivant la durée du contact sérum saturé - solution A - :

- contact très bref, de l'ordre de quelques secondes : 2,7 % du fer sont retrouvés après le passage sur résine.
- contact prolongé, de l'ordre de quelques minutes : 10 % au moins du fer libre ne sont pas soustraits au sérum.

Il est donc assez difficile, ignorant dans quelles conditions exactes furent effectués les essais de Peters, Henry et Bothwell de se faire une idée très précise.

Nous avons pratiqué par ailleurs un test un peu semblable sur un sérum dont la capacité de fixation avait été trouvée nulle à deux reprises par la méthode de contrôle spectrophotométrique :

Nous avons marqué ce sérum en lui ajoutant 0,2 cm3 de notre solution mère radioactive et avons trouvé une LIBC égale à 30, valeur correspondant à un pourcentage de fer non déplacé de 8 %. La même détermination, effectuée deux jours plus tard, sans incubation, c'est-à-dire en ajoutant la résine immédiatement après le marquage, nous donna une LIBC égale à 13, représentant un pourcentage de fer restant de 3,5 seulement.

Ces chiffres correspondent assez bien aux valeurs exposées ci-dessus et nous permettent de penser que tout en restant d'une efficacité suffisante pour engendrer des déterminations vraisemblables et relativement exactes, la résine est dans l'impossibilité de déplacer la totalité du fer libre excédentaire.

3 - Reproductibilité des résultats

Dans le but d'étudier la reproductibilité et la précision des mesures, nous avons opéré des dosages successifs sur une série de 12 sérums de saignée, conservés à 4° au réfrigérateur.

De nombreuses mesures furent effectuées un mois après le prélèvement, quatre dosages furent même pratiqués plus de 40 jours après la saignée.

La plupart de nos déterminations initiales n'ayant pas été faites le jour même de la prise de sang mais un, deux, parfois même huit jours après, nous avons pour faciliter la présentation, envisagé chaque valeur par rapport à la détermination de départ considérée comme temps T.o et non par rapport au jour où fut effectuée la saignée.

Dans ces conditions, nous obtenons une reproductibilité des mesures au bout de :

- 2 jours de 1,4 %
- 5 jours de 6,8 %
- 8 à 10 jours de 4,5 %
- 20 à 30 jours de 4,9 %
- 30 à 45 jours de 4,1 %

TABLEAU III

Reproductibilité au bout de 2 jours

Numéros	I B C		Différence	Pourcentages
	Départ	2 jours après		
2	192	193	+ 1	+ 0,52
4	75	78	+ 3	+ 4
9	155	150	- 5	- 3,2
12	206	208	+ 2	- 0,97
Moyenne			+ 0,25	± 0,59
Déviation standard des valeurs				± 1,37

En somme, on est autorisé à admettre si l'on se refère à ces résultats, que même après un mois la détermination de la LIBC selon notre procédé est encore valable puisque la reproductibilité ne varie que de 1,4 % au deuxième jour jusqu'à 4,1 % au quarante-cinquième jour.

Nous récapitulons par ailleurs dans le tableau VIII, toutes nos mesures. Celles-ci se reproduisant assez fidèlement, nous permettent donc d'accorder une valeur certaine à ce procédé.

TABLEAU IV

Reproductibilité au bout de 5 jours

Numéros	I B C		Différence	Pourcentages
	Départ	5 jours après		
2	192	187	- 5	- 2,6
3	158	130	- 28	- 17
5	120	112	- 8	- 6,6
10	195	170	- 25	- 12
11	116	108	- 8	- 6,8
1	244	255	+ 11	- 4,5
Moyenne				± 6,7
Déviation standard des valeurs				± 6,8

TABLEAU V

Reproductibilité 8 à 10 jours après

Numéros	I B C		Différence	Pourcentages
	Départ	8 à 10 jours après		
12	206	205	- 1	- 0,48
1	244	243	- 1	- 0,40
4	75	86	+ 11	+ 14,6
9	155	153	- 2	- 1,2
2	192	194	+ 2	+ 1
5	120	125	+ 5	+ 4,1
7	134	144	+ 10	+ 7,4
8	166	164	- 2	- 1,2
10	195	175	- 20	- 10
Moyenne				± 1,53
Déviation standard des valeurs				± 4,5

TABLEAU VI

Reproductibilité 20 à 30 jours

Numéros	I B C		Différence	Pourcentages
	Départ	20 à 30 j. après		
1	244	243	- 1	- 0,41
2	192	187	- 5	- 2,6
3	158	137	- 21	- 13,2
4	75	76	+ 1	+ 1,3
5	120	112	- 8	- 6,6
8	166	177	+ 11	+ 6,6
9	155	154	- 1	- 0,64
Moyenne				± 2,22
Déviation standard des valeurs				± 4,9

TABLEAU VII

Reproductibilité 30 à 45 jours

Numéros	I B C		Différence	Pourcentages
	Départ	30 à 45 j. après		
1	244	227	- 17	- 6,9
2	192	169	- 23	- 11,9
3	158	147	- 11	- 6,9
4	75	78	+ 3	+ 4
5	120	116	- 4	- 3,3
Moyenne				± 5,7
Déviation standard des valeurs				± 4,1

TABLEAU VIII

N°	Nombre de jours après la prise de sang																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	25	30	35	40	45
1									244		266			255		255		244	243	251	210	227
2		192		193			187		196	194						184		187	182	169	167	
3		158			158		130	130							141		133	137		144	147	
4		75		78		95			72			86						76	67		78	
5	120			118		112	126		125								112					116
6		60	68							65						59	74					
7				134								144			125		147					
8		166	173							164							176	177	169			
9		155		150							153						144		154			
10		195	182				170				175					191						
11		116	108				108									117						
12	206		208						205			195		203		200						

REPRODUCTIBILITE DES VALEURS

TABLEAU RECAPITULATIF

4 - Résultats comparatifs

Nous avons tenu, afin d'éprouver d'une façon plus complète encore la validité de notre méthode, à la comparer à une méthode spectrophotométrique, utilisant comme référence la technique de Schade et Caroline, en vigueur depuis plusieurs années dans les Laboratoires de l'Institut Pasteur de Lyon.

A - Technique de Schade et Caroline

Dans chaque cuve du spectrophotomètre, on dépose 1,5 cm3 de sérum physiologique et 1 cm3 de sérum à étudier.

Après avoir effectué la lecture du zéro à 520 mμ, on ajoute dans toutes les cuves, sauf la cuve témoin 20 μl d'une solution de sel de Mohr soit un chiffre correspondant à 40 gamma de fer par 100 cm3 de sérum. On pratique alors, lorsque l'équilibre de la densité optique est obtenue, c'est-à-dire au bout de 3 minutes environ, une deuxième lecture, puis on ajoute de nouveau 20 μl et ainsi de suite jusqu'à ce que la valeur de la densité optique soit restée la même à trois lectures successives.

La quantité de fer ajoutée correspond à la capacité latente de fixation en fer du sérum étudié.

B - Résultats

Nous avons effectué par cette méthode 80 dosages comparatifs. 64 seulement d'entre eux ont été retenus, la détermination optique de la LIBC de certains sérums lactescents, troubles ou d'une forte teneur hémoglobinique s'étant avérée très difficile, voire impossible.

Nous avons classé les valeurs comparatives obtenues en 3 catégories, d'après l'importance de la LIBC déterminée par la technique photométrique de contrôle.

Nous envisagerons donc successivement :

- les valeurs nulles, correspondant aux sérums saturés.
- les valeurs comprises entre 40 et 240 gamma.
- les valeurs supérieures à 260 gamma.

a) Valeurs nulles

Huit des sérums que nous avons testés avaient une capacité de fixation nulle. Mais il ne nous a pas été possible avec notre méthode, de vérifier la réalité de la saturation, les valeurs que nous avons obtenues étant toutes supérieures à 25 gamma pour 100 cm3, deux d'entre elles dépassant même 50 gamma.

Pour une capacité nulle nous avons trouvé les chiffres suivants :

30 - 26 - 95 - 70 - 40 - 33 - 38 - 25 -

b) Valeurs comprises entre 40 et 240 gamma

Nous avons reproduit nos résultats comparatifs dans le tableau IX ci-après.

TABLEAU IX

de 40 à 120			de 160 à 240		
N°	Fe 59	Contrôle	N°	Fe 59	Contrôle
1	95	120	1	196	240
2	74	80	2	158	160
3	26	40	3	125	160
4	71	80	4	187	200
5	51	40	5	155	160
6	86	80	6	156	160
7	75	40	7	116	180
8	50	40	8	195	240
9	67	80	9	182	200
10	130	120	10	119	160
11	125	120	11	189	200
12	123	120	12	232	240
13	113	120	13	172	160
14	112	120	14	179	200
15	114	80	15	194	200
16	70	80	16	187	160
17	117	120	17	205	200
18	86	50	18	160	180
19	79	120	19	151	200
			20	153	160
			21	176	200
			22	157	160
Moyenne	87	86	Moyenne	170	187

Une telle concordance des résultats n'appelle évidemment aucun commentaire.

c) Valeurs supérieures à 260 gamma

TABLEAU X

Numéros	Fe 59	Contrôle
1	259	260
2	351	360
3	266	280
4	312	440
5	253	320
6	320	440
7	252	320
8	298	360
9	334	360
10	234	280
11	320	480
12	234	280
13	343	480
14	312	320
15	261	320
16	356	360
17	232	320
18	147	260
19	195	320
Moyenne	277	345

Les résultats obtenus avec l'une et l'autre méthodes diffèrent ici prodondément dans plus de 50 % des cas.

L'analyse de ces trois tableaux comparatifs nous obligerait donc à admettre que notre méthode n'est valable que pour les déterminations qui sont effectuées sur des sérums dont la capacité de fixation est comprise entre 40 et 260 gamma, ce qui en limiterait singulièrement son application.

Aussi avons-nous essayé avant de porter un jugement définitif, de faire une étude critique de la discordance de ces résultats.

C H A P I T R E VII

ETUDE CRITIQUE DE LA DISCORDANCE DE CERTAINS RESULTATS

Les résultats que nous obtenons avec notre méthode étant, nous l'avons vu, très différents parfois de ceux qui sont fournis par la méthode de Schade et Caroline, nous avons tenté de faire une étude critique de cette discordance qui, rappelons-le, se manifeste dans deux cas très précis :

- Lorsque le sérum à analyser est saturé.
- Lorsque la valeur de sa capacité de fixation, déterminée par lecture spectrophotométrique est très élevée, comprise entre 300 et 440 gamma.

1 - Dans le cas d'un sérum saturé

L'obtention de valeurs toujours supérieures à 25 gamma lorsque l'on effectue le dosage sur un sérum dont on a vérifié préalablement la saturation, s'explique en fait très aisément. Nous avons vu en effet au chapître VI que la résine utilisée s'avérait incapable d'éliminer la totalité du fer libre excédentaire et l'avons démontré en pratiquant un certain nombre de tests. Nous avons même tenté à deux reprises de doser par l'orthophénantroline la quantité de fer ayant échappé à l'action de la résine mais sans succès. Le pH joue en effet un rôle essentiel pour favoriser ou rompre les combinaisons que contracte la sidérophiline avec les ions métalliques. Ces combinaisons commencent à se dissocier vers pH6 et le sont complètement à pH4. Or, nous avons opéré pour ce dosage, effectué suivant la technique de Heilmeyer et Plotner, à pH4,6.

Cette insuffisance de la résine ne nous semble cependant pas être un obstacle à la vulgarisation de la méthode, car il importe peu au clinicien de savoir à quelques gamma près quelle est la valeur de la capacité de fixation d'un sérum.

Quoiqu'il en soit, nous avons décidé d'admettre comme correspondant à un échantillon saturé, toute valeur inférieure à 30 gamma.

2 - Dans le cas d'une capacité de fixation très élevée

En analysant l'ensemble des résultats que nous avons consignés dans le tableau X, on est surpris d'abord par le fait qu'ils ne sont pas tous discordants, six d'entre eux coïncidant même très exactement avec ceux que nous fournit la méthode photométrique de contrôle, mais aussi par le fait qu'ils sont tous inférieurs, ce qui cadre mal, avec ce que nous venons d'exposer ci-dessus quant à l'efficacité de la résine. L'écart constaté excède enfin dans quelques cas 100 gamma pour 100 cm3.

- Nous nous sommes aperçus en vérifiant l'ensemble de ces résultats différents, que deux d'entre eux, bien que très inférieurs, étaient cependant parfaitement logiques : les sérums n° 6 et 11 furent en effet testés en utilisant une solution mère dont la teneur en fer était de 6,4 gamma pour 0,2 cm3 c'est-à-dire insuffisante pour atteindre leur degré de saturation.

- Par ailleurs, nous avons pu refaire dans deux cas (sérums n° 18 et 19) une deuxième détermination photométrique. Celle-ci fut effectuée 48 heures après la détermination initiale. Nous avons obtenu les valeurs suivantes :

Pour le sérum n° 18 : 120 au lieu de 260
" " " n° 19 : 240 au lieu de 320

Tandis qu'avec notre technique au Fe 59 les valeurs restaient inchangées :

soit 150 pour le sérum n° 18
soit 198 " " " n° 19

Faut-il envisager dans ces conditions la possibilité d'une erreur systématique dans la détermination initiale photométrique ? Nous ne le pensons pas, bien que n'ayant vérifié les dosages de contrôle que dans deux cas seulement, sous peine de

remettre en question la validité maintes fois éprouvée de la méthode de Schade et Caroline.

Comment expliquer alors qu'en dépit de l'insuffisance réelle de la résine, nous obtenions dans un certain nombre de cas des valeurs très inférieures, l'écart moyen se situant aux alentours de 60 gamma mais pouvant atteindre 140 gamma ?

Nous nous sommes demandé afin de tenter de donner une explication à ce paradoxe, si sous l'effet de la surcharge en fer, certains sérums n'étaient pas capables d'augmenter encore leur LIBC avec une fixation supplémentaire du fer sur la sidérophiline ou sur tout autre protéine, la liaison fer-protéine s'avérant alors très fragile et susceptible d'être brisée par la seule adjonction de résine.

Il ne nous a pas été possible encore de vérifier le bien-fondé de cette hypothèse qui peut cependant s'appuyer sur deux faits :

A - La transferrine n'aurait pas toujours le monopole du transport ferrique.

Un certain nombre d'auteurs et en particulier Faber et Jordal, sont en effet parvenus récemment à démontrer que d'autres protéines peuvent dans certains cas, servir au même titre que la transferrine au transport du fer. Ces auteurs après avoir marqué un sérum avec du radio-fer, effectuent une migration électrophorétique puis mesurent la radioactivité de chaque fraction. Ils retrouvent ainsi 88,2 % du radio-fer dans la bande des bêta globulines, mais aussi 5,7 % dans la zone des alpha 2 et 6 % dans celle de l'albumine et des alpha 1. Ce phénomène observé "in vitro" l'est également, mais moins nettement peut-être "in vivo", la mesure de la radioactivité après électrophorèse d'un sérum prélevé 15 minutes après l'injection intraveineuse d'une certaine quantité de sérum ou de plasma marqué donnant les chiffres suivants :

- bêta globulines : 93,2 %
- alpha 2 globulines : 1,3 %
- albumine + Alpha 1 globulines : 5,5 %.

B - Certaines remarques concernant les courbes d'hypersidérémie provoquée

Une étude systématique des courbes d'hypersidérémie provoquée, pratiquée récemment dans les laboratoires de chimie hématologique de l'Institut Pasteur de Lyon par Monsieur le Professeur agrégé CREYSSEL, Monsieur le Docteur HOLLARD et Madame MARTEL, a permis de noter que chez certains sujets, le plus souvent porteurs d'anémie hypochrome sidéropénique, le fer sérique, déterminé après ingestion d'un sel de fer, dépassait d'une façon très significative la valeur de la capacité totale de fixation du fer et du sérum telle qu'elle avait été déterminée avant l'épreuve.

On peut donc se demander si ce phénomène observé "in vivo" ne correspond pas à celui que nous avons mis en évidence "in vitro" et si en définitive les différences observées ne tiennent pas au fait que la technique au radio-fer permet le dosage de la capacité de fixation de la seule sidérophiline et non de celle du sérum.

Quoi qu'il en soit, cette étude ne pouvant se présenter que comme le début d'un travail qu'il sera nécessaire de poursuivre encore longtemps, nous pensons qu'actuellement, il est préférable, lorsque la capacité de fixation en fer d'un sérum s'avère, avec notre méthode, comprise entre 300 et 350 gamma pour 100 cm3, de pratiquer un dosage de contrôle par la méthode spectrophotométrique de Schade et Caroline.

Cette dernière, classiquement, ne peut être effectuée que le jour même du prélèvement, à la rigueur le lendemain. En fait, nous nous sommes aperçu en effectuant des contrôles sur des sérums stockés durant 20 à 30 jours au réfrigérateur, que de nombreuses déterminations pratiquées dans de telles conditions par cette méthode, restaient invariables.

Nous exposons dans le tableau ci-après, les résultats comparatifs obtenus immédiatement après la prise de sang et après un stockage de 3 semaines à 4°.

TABLEAU XI

Sérum n°	LIBC initiale			20 à 30 jours après	
	Fe 59	Contrôle optique		Fe 59	Contrôle
1	266	280		251	Impossible
2	196	240		182	200
3	155	160		182	Impossible
4	158	160		147	200
7	79	120		76	120
8	176	200		169	Impossible
9	206	280		203	280
10	147	260		144	Aberrant
15	95	120		78	120
27	74	80		91	Aberrant

C H A P I T R E VIII

C O N C L U S I O N S

INTERET DE LA METHODE. SES LIMITES

Nous avons expérimenté une nouvelle technique de dosage de la capacité de fixation en fer du sérum utilisant le fer radioactif et une résine échangeuse d'ions.

1 - Ses avantages sont nombreux :

a) - il s'agit en effet d'une méthode simple et rapide, demandant un petit nombre de manipulations et faisant appel à un minimum réactif, mais nécessitant cependant l'équipement indispensable à toute investigation isotopique.

b) - méthode par ailleurs beaucoup plus précise que les techniques spectrophotométriques qui ne peuvent donner que des valeurs approchées.

c) - méthode enfin permettant le dosage de la capacité de fixation de tout sérum, qu'il soit trouble, lactescent ou ictérique.

2 - Il faut toutefois reconnaître les limites :

a) - lorsque l'on opère sur un sérum saturé, les résultats étant faussés du fait de l'impossibilité qu'a la résine de déplacer la totalité du fer libre excédentaire.

b) - lorsque la capacité de fixation est très élevée, les valeurs obtenues diffèrent alors profondément dans plus de 50 % des cas de celles qui sont données par la méthode classique de Schade et Caroline, ce qui permet de formuler un certain nombre d'hypothèses intéressantes concernant la liaison fer-protéines.

Le Président de la Thèse :
Professeur CROIZAT

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 11 Mai 1962

Vu, le Doyen :
H. HERMANN.

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université
P. LOUIS.

B I B L I O G R A P H I E

BARKAN (G.) - Uber Bestimmungsmethodik und Eigenschalten der "leicht abspaltabaren" Bluteisens.
Ztsch. Physiol. chem., 1933, 215, 1.

BARKAN (G.), SCHALES (O.) - Chemister Aufban und physiologische Bedeutung der "leicht abspaltaren" Bluteisens.
Ztsch. Physiol. chem., 1937, 247, 96.

BARKAN (G.), WALKER (B.S.) - Determination of iron and pseudo-hemoglobin iron with ortho-phenantrolin.
J. Biol. Chem., 1940, 135, 37.

BEALE (R.N.), BOSTROM (J.O.), TAYLOR (R.F.) - Rapid incremental methods for the determination of serum iron binding capacity.
J. clin. Path., 1961, 14, 488.

BOTHWELL (T.H.), MALLET (B.) - The determination of iron in plasma or iron.
Biochem J., 1955, 59, 599.

BOTHWELL (T.H.), HURTADO (A.V.), DONOHUE (D.M.), FINCH (C.A.) - Erythrokinetics. The plasma iron turnover as a measure of erythropoiesis.
Blood, 1957, 12, 409.

BOTHWELL (T.H.), JACOBS (P.), KAMENER (R.) - The determination of the Unsaturated iron binding capacity of serum using radioactive iron.
S. Afric. J. Med. Sci., 1959, 24, 93.

BRAUNSTEINER (H.), GISINGER (E.), PAKESCH (F.) - Ferritin, transferrin und serumeisen.
Klin. Wschech. 1952, 30, 394.

CARWRIGHT (G.E.), WINTROBE (M.M.) - Chemical, clinical and immunological studies on products of human plasma fractionation ; Anemia of infection ; Studies on iron binding capacity of serum.
J. Clin. Invest., 1949, 28, 86.

DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (G.) - Le fer sérique.
Le sang, 1949, 20, 374.

DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (G.) - Sidérophiline.
Bull. Soc. chim. Biol., 1955, 37, 541.

DREYFUS (J.C.), SCHAPIRA (G.) - Le fer. Biochimie, physiologie, pathologie.
Livre : Expansion Scientifique française, 1958.

DUBACH (R.), MOORE (C.V.), CALLENDER (S.T.) - Studies on iron transformation and metabolisme ; IX. The excretion of iron measured by the isotope Technique.
J. Lab. clin. Med., 1955, 45, 599.

FABER (M.), JORDAL (R.) - Presence of two transports proteins in Serum.
Nature, 1961-1962, 181.

FEINSTEIN (A.), BETHARD (W.), MAC CARTHY (J.) - A new method using radioiron for determining the iron-binding capacity of human serum.
J. Lab. clin. Med., 1953, 42, 907.

FINCH (C.A.) - Iron metabolism in hemochromatosis.
J. clin. Invest., 1949, 28, 781.

FINCH (C.A.), GIBSON (J.G.), PEACOK (W.C.), FLUHARTY (R.G.) - Iron metabolism. Utilisation of intravenous radioactive iron.
Blood, 1949, 4, 905.

FLEXNER (L.R.), VOSBURGH (J.), COWIE (D.) - Capillary permeability rate of transcapillary exchange of iron added to plasma as radioactive ferric bêta globulinate.
Amer. J. Physiol., 1948, 153, 503.

FONTES (G.), THIVOLLE (L.) - Sur la teneur du sérum en fer non hémoglobinique, et sur sa diminution au cours de l'anémie expérimentale.
C.R. Soc. Biol., 1925, 93, 687.

GOLHEN (A.) - Contribution à l'étude de la capacité totale de fixation en fer du sérum.
(A propos de 1500 dosages), 1958, Thèse de Lyon.

GRANICK (S.) - Iron metabolism.
Bull. New York Ac. Med., 1954, 30, 81.

HAGBERG (B.) - The iron binding Capacity of serum in infants and children.
Acta Paed., 1953, 42, 589.

HAHN (P.F.), BALE (W.F.), HETTIG (R.A.), KAMEN (M.D.), WHIPPLE (G.H.) - Radioactive iron and its excretion in Urine, bile and feces.
J. Exper. Med., 1939, 69, 739.

HAHN (P.F.) - The use of radioactive isotopes in the study of iron and hemoglobin metabolism and the physiology of the red bload Cell.
Adv. Biol. Med. Phys. New York Acad. Press, 1948, 1, 288.

HEILMEYER (L.), PLOTNER (K.) - Das serumeisen und die Eisenmangelkrankheit,
Iena Fischer, 1937.

HEILMEYER (L.) - Spectrophometry in Medicine (Translated by Jordan).
A. Hilger Ltd, London 1943.

HEMMLER (G.) - Le Métabolisme du fer.
Livre Masson, Paris, 1952.

HENRY (R.J.), SOREL (C.H.), CHIAMORY (N.) - On the determination of serum iron and iron binding capacity.
Clin. chim. Acta, 1958, 3, 523.

HOLLARD (D.), MARTEL (P.), CREYSSEL (R.) - Quelques remarques sur la valeur des épreuves d'hypersidérémie provoquée au cours des sidéropénies. Charge per os par un sel de fer bivalent.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1962, 7, 192.

HOLMBERG (C.G.), LAURELL (C.B.) - Studies on the capacity of serum to bind iron.
Acta Physiol. Scand., 1945, 10, 307.

HUFF (R.L.), HENNESSY (T.G.), AUSTIN (R.E.), GARCIA (J.F.), ROBERTS (B.M.), LAWRENCE (J.H.) - Plasma and red cell iron turnover in normal subject and in patients having various hematopoietic disorders.
J. clin. Invest., 1950, 29, 1041.

HUFF (R.L.), ELMINGER (P.J.), GARCIA (J.F.), ODA (F.M.), COCKRELL (M.C.), LAWRENCE (J.M.) - Ferrokinetics in normal persons and in patients having various erythropoietic disorders.
J. clin. Invest, 1951, 30, 1512.

KALDOR (I.) - Studies on intermediary iron metabolism. III. The value of serum iron and iron binding capacity measurements in clinical diagnosis.
Austral. Ann. Med., 1953, 11, 1.

LAURELL (C.B.) - Studies on the transportation and metabolism of iron in the body.
Acta Physiol. Scand, 1947, 11, Supp. 46.

LAURELL (C.B.) - What is the functions of transferrin in plasma.
Blood, 1951, 6, 183.

LAURELL (C.B.) - Plasma iron and transport of iron in organism.
Pharmacological review, 1953, 371.

LAURELL (C.B.) - Isolation and properties of crystalline Fe-transferrin from Pig's Plasma.
Acta chem. Scand., 1953, 7, 1407.

LEDERER (J.) - Le métabolisme du fer.
Louvain, 1940.

LEDERER (J.) - Sur la nature du fer sérique. Etude de la fraction IV. 7 des globulines.
Arch. Intern. Pharmacol. Therap., 1948, 77, 104.

LEE (N.D.), CHIAMORY (N.) - A simple radioisotope micromethod for determination of Unsaturated iron binding capacity of serum.
Clin. Acta, 1961, 6, 624.

LEVY (A.L.), VITACCA (P.) - Direct determination and binding capacity of serum iron.
Clin. chem., 1961, 7, 241.

MANDEL (E.E.) - Serum iron and iron binding capacity in clinical diagnosis.
Clin. Chem., 1959, 5, 1.

MOORE (C.V.), ARROWSMITH (W.R.), WELCH (J.), MINNICH (V.) - Studies in iron transportation and metabolism. IV. Observations on the absorption of iron from the gastro-intestinal tract.
J. Clin. Invest., 1939, 18, 553.

MOORE (C.V.), DUBACH (R.), MINNICH (V.), ROBERTS (H.K.) - Absorption of ferrous and ferric and radioactive iron by human subjects and by dogs.
J. Clin. Invest., 1944, 23, 755.

MORGAN (E.H.) - Plasma iron and IBC levels in health and diseases: with an improved method for the determination of plasma iron and total IBC.
Aust. Ann. Med., Août 1960.

MORGAN (E.H.) - Plasma iron and iron binding capacity in the pregnant rat and rabbit.
Nature, 1961, 192, 246.

NAJEAN (Y.), BOIRON (M.) - Utilisation du fer radioactif pour le calcul de l'erythropoïèse. Désaccord des résultats fournis par cette méthode avec les données classiques du métabolisme du fer. Notes de technique.
Extraits de la rev. franc. et clin. biol., 1959, 1, 72.

NAJEAN (Y.) - Etude expérimentale et clinique de diverses insuffisances de l'erythropoïèse,
1959, Thèse Med. Paris.

NAJEAN (Y.) - Etude du métabolisme du fer "In Vivo" et "in Vitro" dans l'anémie hypochrome hyposidérémique. Volume, siège et mouvements des compartiments préhéminiques du fer.
Nouvelle Revue Fr. Hemat., 1962, 2, 39.

NEUKOMM (S.) - Contribution à l'étude des rapports entre le fer sérique et les protéines plasmatiques.
Hel. méd. Acta., 1947, 14, 453.

PAGLIARDI (E.) - Le problème du fer transporté dans le sérum. La transferrine : détermination indirecte et valeur pratique en clinique.
Progresso. med., 1951, 7, 325.

PAOLETTI (C.) - Les rapports du fer plasmatique et de la synthèse de l'hémoglobine étudiés au moyen du fer radioactif. 1958, Thèse de Sciences, Paris.

PAOLETTI (C.), BOIRON (M.), TUBIANA (M.), TRUHAUT (R.) BERNARD (J.) - Fer plasmatique et synthèse de l'hémoglobine.
Le Sang, 1958, 29, 492.

PETERS (T.), APT (L.) - Iron binding capacity of abnormal sera.
Clin. Res. Proc., 1955, 3, 93.

PETERS (T.), GIOVANNIELLO (T.J.), APT (L.), ROSS (J.F.) - A new method for the determination of serum iron binding capacity I.
J. Lab. clin. Med., 1956, 48, 274.

PETERS (T.), GIOVANNIELLO (T.J.), APT (L.), ROSS (J.F.) - A simple improved method for the determination of serum iron II.
J. Lab. clin. Med., 1956, 48, 280.

PLANAS (J.) - Serum iron and total iron binding capacity in certain mammals.
Nature, 1960, 167, 1126.

RAMSAY (W.N.M.) - The determination of the total iron binding capacity of serum.
Clin. chem. Acta., 1957, 2, 221.

RATH (C.E.), FINCH (C.A.) - Chemical, clinical and immunological studies in products of human plasma fractionnation ; serum iron transport, measurement of iron binding capacity of serum in man.
J. Clin. Invest., 1949, 28, 79.

RESSLER (N.), ZAK (B.) - Serum unsaturated iron binding capacity.
Amer. J. Clin. Path., 1958, 30, 87.

SCHADE (A.L.), CAROLINE (L.) - An iron binding component in human blood plasma.
Sciences, 1946, 104, 340.

SCHADE (A.L.), OYAMA (J.), REINHARDT (R.W.), MILLER (J.R.) - Bound iron and unsaturated iron binding capacity of serum : rapid and reliable determination.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 87, 443.

SCHAPIRA (G.) - Le fer radioactif dans le diagnostic de laboratoire.
Sem. Hop. Paris, 1953, 29, 1416.

SCHAPIRA (G.), DREYFUS (J.C.) - Fer et nutrition.
Ann. Nutr. et alim., 1955, 9, 39.

SURGENOR (D.M.), KOECHLIN (B.A.), STRONG (L.E.) - Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionnation. XXXVII. The metal combining globulin of human plasma.
J. Clin. Invest., 1949, 28, 73.

TAUXE (W.N.) - A rapid radioactive method for the determination of the serum IBC.
Amer. J. Clin. Path., 1961, 35, 403.

THORN (M.), CANHAM (P.), GILMAN (T.) - Plasma iron and total iron binding capacity in male african labourers.
S. Afr. J. Lab. Clin. Med., 1961, 7, 114.

TINGUELY (C.R.), LOEFFLER (R.K.) - Method for determining iron binding capacity of serum.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1956, 92, 241.

TOMPSETT (S.G.) - The iron of the plasma.
Biochem. J., 1940, 34, 959.

TRINDER (P.) - The improved determination of serum iron.
J. Clin. Path., 1956, 9, 170.

TUBIANA (M.) - Les isotopes radioactifs en médecine et en biologie.
Livre, 1950, Masson et Cie, édit.

VAHLQUIST (B.) - Das serumeisen.
Acta Paed. Scand., 1941, 28, Supp. 5.

VANNOTI (A.) - Etude du métabolisme du fer à l'aide d'un isotope radioactif.
J. thérapeutique, Paris, 1946, 101, Doin édit.

VENTURA (S.) - Determination of the Unsaturated iron binding capacity of serums.
J. Clin. Path., 1952, 5, 271.

YEOSTROS (S.J.) - New method of determining latent iron binding capacity of serum, using radioiron ; its clinical signifiance.
Bull. Milhard Fillmore Hosp., 1961, 8, 89.

YUILE (C.H.), HAYDEN (J.), TESLUK (H.), STEWART (W.) - Plasma iron and saturation of plasma iron, binding protein in dogs as related to the gastrointestinal absorption of radioiron.
J.Exp. Med., 1950, 92, 566.

TABLE DES MATIERES

Pages

I - Introduction 1

II - Le radio-fer dans le diagnostic de Laboratoire 3

III - Les méthodes de dosage de la capacité de fixation en fer du sérum 6

1) La méthode de surcharge "in vivo" 6
2) La méthode de Schade et Caroline 6
3) Les méthodes indirectes 6

IV - Technique utilisée 9

1) Préparation des réactifs 9
2) Prélèvement des échantillons 11
3) Technique proprement dite 12
4) Détermination par le calcul de la LIBC 13
5) Sécurité à l'égard des radiations 14
6) Problème de la décontamination du matériel 15

V - Résultats 16

1) Choix des échantillons 16
2) Valeur de la LIBC chez le sujet normal 16

VI - Validité de la méthode 19

1) Rendement du marquage 19
2) Efficacité de la résine 20
3) Reproductibilité des résultats 22
4) Résultats comparatifs 27

VII - Etude critique de la discordance de certains résultats 31

VIII - Conclusion : Intérêt de la méthode, Ses limites. 36

Bibliographie 38

HECEY - LYON.